

مطالعه اثر زیر واحد پروتئین کالپروتکتین S100A9 بر وضعیت بیان و متیلاسیون پروموتور ژن

OCN در رده سلولی A-375 ملانوما انسانی

چکیده:

زمینه: عدم کنترل سلولی یکی از مهمترین دلایل شروع سرطان می باشد. سرطان یکی از رایج ترین بیماریها در جهان به شمار می رود که متأسفانه با توجه به رشد روز افزون بشر در علم رو به گسترش است. ملانوما، نوعی سرطان بدخیم پوست می باشد که بخاطر متاستاز به مغز، درمان آن دچار چالش جدی می باشد. امروزه به دلیل اثرات سوء داروهای شیمیایی، پرتودرمانی و جراحی، ترکیبات طبیعی در درمان سرطان مورد توجه محققان بوده است. کالپروتکتین به خانواده ای از پروتئین ها به نام پروتئین های S100 تعلق دارد که در تنظیم بسیاری از فرآیندهای سلولی نظیر انتقال پیام، تمایز، کنترل چرخه سلولی، تنظیم فرآیند التهاب و پاسخ ایمنی نقش دارند. زیرواحدهای S100A8/S100A9 می توانند در پروسه التهاب به عنوان القاء کننده تومور و یا در پروسه سرطان بعنوان القاء کننده التهاب ایفای نقش کنند. آنها میتوانند اثرات دوگانه ضدتوموری و نیز القاء کنندگی ایجاد تومور را داشته باشند. یکی از ژنهایی که می تواند در پروسه متاستاز سرطان نقش حیاتی داشته باشد ژن *OCN* می باشد که یک تومور ساپرسور می باشد و پروتئینی بنام آکلودین را کد می کند که نقش مهمی در ساختمان اتصالات محکم دیواره سلولی و انسجام آن دارد. اختلال در عملکرد آن با بیماری های التهابی و متاستاز سرطان همراه می باشد.

هدف: این مطالعه به منظور بررسی اثر زیر واحد کالپروتکتین S100A9 با غلظت های متفاوت و بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر بیان ژن *OCN* و متیلاسیون پروموتور این ژن در رده سلولی ملانوما انسانی A-375 انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سلولهای سرطانی ملانوما با غلظت های مختلف S100A9 از ۰ تا ۱۰ میکرومول تیمار شدند تا میزان سایتوتوکسیسیتی و IC50 این ترکیب توسط تست MTT تعیین گردد. پس از

بدست آوردن غلظت های مناسب، سلولها با غلظت های ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میکرومولار در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. سلولها به دو گروه تقسیم شدند: یک گروه پس از استخراج DNA و تیمار با بیسولفیت، جهت بررسی وضعیت متیلاسیون پروموتر، MSP-PCR انجام شد و گروه دیگر پس از استخراج RNA با استفاده از کیت و سنتز cDNA، برای تعیین میزان بیان ژن Real Time PCR انجام شد.

یافته ها:

نتایج حاصل از تست MTT با غلظت های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ نانومولار و همچنین با غلظت های ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میکرومولار نشان دادند که غلظت های زیر ۱ میکرو مولار اثر سایتوتوکسیسیتی نداشته ولی هر چه غلظت پروتئین بالاتر رفت اثر سایتوتوکسیسیتی نیز بیشتر شد. و IC₅₀ برای بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۲/۵، ۶/۵ و ۵/۶ میکرومولار بود. تعیین میزان بیان این ژن با استفاده از Real Time PCR نشان داد که با افزایش غلظت S100A9 میزان بیان ژن OCLN کمتر می شود. همچنین بررسی پروموتر این ژن نشان داد که وضعیت آن بصورت سمی متیله می باشد و این پروتئین نیز تغییری در وضعیت آن ایجاد نکرد.

بحث و نتیجه گیری:

با توجه به یافته ها، اگر چه S100A9 خاصیت سایتوتوکسیسیتی برای سلول های ملانومایی داشت و در مطالعات پیشین نیز این یافته تایید شده بود ولی بیان ژن کاهش پیدا کرد البته با توجه به خاصیت دوگانگی این پروتئین در غلظت های متفاوت اثرات متفاوتی دارد در ضمن با توجه به سمی متیله بودن پروموتر بیان ژن نسبت به کنترل داخلی پایین بود و با توجه به کیفی بودن روش متیلاسیون امکان بررسی جزیی وضعیت متیلاسیون وجود نداشت. بیان ژن سلولهای تیمار شده نسبت به کنترل (بدون تیمار) کاهش پیدا کرده بود که نشان می دهد در این مطالعه و با غلظت های استفاده شده S100A9 باعث از بین رفتن استحکام و انسجام سلولی شده و در نتیجه باعث متاستاز در سلول می گردد از طرف دیگر با داشتن خاصیت سایتوتوکسیسیتی در سلولهای ملانوما امکان افزایش آپوپتوزیس و کاهش بقا سلول می گردد.